

**EXTRAKTION UND RADIOIMMUNOLOGISCHE
BESTIMMUNG VON β -ENDORPHIN IM SERUM**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

Monika Schmitz

1982

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

EXTRAKTION UND RADIOIMMUNOLOGISCHE
BESTIMMUNG VON β -ENDORPHIN IM SERUM

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN
MEDIZIN AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

Monika Schmitz geb. Ehinger
aus Friedrichshafen

1982

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK UNIVERSITÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. G. BUCHNER

EXTRAKT UND RADIOLOGISCHE
BESTIMMUNG VON B-INDOPHILIN IM SERUM

DIAGNOSTIK - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER RECHTEN
MEDIZIN AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
ZU MÜNCHEN



Dr. med. G. BUCHNER

Dr. med. G. BUCHNER
Dr. med. G. BUCHNER

1932

Das Exemplar der Dissertation ist dem Bibliotheksarchiv der Universität Leiden 1932

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. O. A. Müller
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.1982

MEINEM MANN

MEINEM MANN

Mein Dank gilt

Herrn PD Dr. med. O. A. Müller für die Überlassung des
Themas und für die Unterstützung und Förderung, die er
mir und dieser Arbeit gewährte sowie für die Betreuung
und Beratung während der Versuche,

Herrn Dr. med. G. K. Stalla für die Beratung während
einiger Versuche sowie die beim Verfassen der Arbeit
gewährte Hilfe,

Frau R. Egger und Fräulein Ch. Uhlig für die angenehme
Zusammenarbeit,

Frau I. Wiktorin für die sorgfältige Anfertigung der Zeich-
nungen und Fräulein F. Haag für das Ausführen der photo-
graphischen Arbeiten.

A b s t r a c t

SCHMITZ, MONIKA:

EXTRAKTION UND RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON β -ENDORPHIN IM SERUM

Menschliches β -Endorphin wird aus dem Serum extrahiert und anschließend radioimmunologisch bestimmt. Zur Antiserumgewinnung wird β -Endorphin mit Hilfe der Carbodiimidreaktion an Tg gekoppelt. Damit werden Kaninchen immunisiert. Dabei werden Antiseren gewonnen, deren Titer zwischen 1 : 2000 und 1 : 16000 liegen. Das β -Endorphin wird mit der Chloramin T-Methode mit ^{125}J markiert. Dieser Tracer wird durch eine Extraktion mit Quiso gereinigt. Die spezifische Aktivität des Tracers beträgt 260 mCi/mg β -Endorphin. Der RIA wird durchgeführt, indem jeweils 100 μl β -Endorphin-Standardverdünnung und 100 μl Antiserumverdünnung bei 4°C 24 Std. kalt vorinkubiert werden, anschließend erfolgt nach Zugabe von 100 μl Tracer mit einer Aktivität von ca. 10000 cpm/100 l eine heiße Inkubation von 24 Std. bei 4°C . Das freie wird vom antikörpergebundenen Anteil des Antigens mit Hilfe der optimierten Doppelantikörpertechnik getrennt. Die untere Nachweisgrenze der Eichkurven liegt bei 20-95 pg/ml β -Endorphin. Die Extraktion wird mit Kieselgel durchgeführt. Während eines Schüttelvorgangs adsorbiert das β -Endorphin an das Kieselgel und wird anschließend mit einem sauren Elutionsmittel wieder vom Kieselgel gelöst. Die Extraktionsausbeute liegt bei 53-57 %, die Präzision der Extraktion bei 2,4 - 5,4. Es werden zwei synthetische Standardpräparate von zwei verschiedenen Firmen (SERVA, Heidelberg und Peninsula-Laboratories, Californien) bezüglich des Eichkurvenverlaufs miteinander verglichen. Diese beiden Substanzen sind nicht identisch. In beiden homologen RIA's kann im menschlichen Serum β -Endorphin gemessen werden. Es ist nicht geklärt, welches dem menschlichen endogenen β -Endorphin eher entspricht. Gegenüber dem ACTH, β -MSH, α -Endorphin und γ -Endorphin ist keine Kreuzreaktivität vorhanden, gegenüber dem β -LPH ergibt sich eine Kreuzreaktivität von 15 % im Peninsula-RIA und 50 % im Serva-RIA.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL	3
3. ANTISERUMGEWINNUNG	6
3.1. Methodik	6
3.1.1. Antigenherstellung	6
3.1.2. Immunisierung der Kaninchen	7
3.2. Ergebnisse	9
4. RADIOAKTIVE MARKIERUNG	11
4.1. Prinzip der Markierung	11
4.2. Methodik	11
4.3. Ergebnisse	13
4.3.1. Überprüfung der Qualität des Tracers	13
4.3.2. Haltbarkeit des Tracers	14
4.3.3. Spezifische Aktivität des Tracers	14
5. RADIOIMMUNOASSAY	16
5.1. Prinzip des Radioimmunoassay	16
5.2. Nullserum	16
5.3. Standardverdünnungen	17
5.4. Vorversuche und Methoden	17
5.4.1. Kinetikstudien	17
5.4.1.1. Tracerbindung	17
5.4.1.2. Inkubationszeiten	20
5.4.1.3. Trennung mit Hilfe der optimierten Doppel- antikörperteknik	21
5.4.2. Auswertung der Eichkurve	23
5.4.3. Vergleich von Serum- und Puffereichkurve	24

5.4.4.	β -Endorphin-RIA	26
5.5.	Ergebnisse	27
5.5.1.	Unterschiedliche Standardpräparate	27
5.5.2.	Kreuzreaktivität gegenüber anderen Hormonen	29
5.6.	Versuch zur Bestimmung des humanen β -LPH	30
5.6.1.	Tracerherstellung	30
5.6.2.	Antiserum	33
5.6.3.	Ergebnisse	34
6.	EXTRAKTION	36
6.1.	Prinzip	36
6.2.	Methodik	36
6.3.	Vorversuche zu den Elutionsbedingungen	37
6.4.	Ergebnisse	39
7.	GESAMTMETHODE RIA UND EXTRAKTION	40
7.1.	Intra-Assay-Variation	40
7.2.	Verdünnungstest	40
7.3.	Klinische Ergebnisse	41
8.	DISKUSSION	44
9.	ZUSAMMENFASSUNG	49
10.	LITERATUR	52
11.	LEBENS LAUF	59

ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
AS	Aminosäure bzw. Aminosäuresequenz
B	gebundenes Antigen
B_o	Maximalbindung
CDI	Carbodiimid
Ci	Curie
cpm	Zählrate pro Minute
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
IC	Intercept
LPH	Lipotropes Hormon, Lipotropin
h- β -LPH	menschliches β -Lipotropin
p- β -LPH	Schweine- β -Lipotropin
MSH	Melanozyten Stimulierendes Hormon
n	Probenanzahl
N	unspezifische Bindung
PEG	Polyäthylenglykol
RIA	Radioimmunoassay
RRA	Radioreceptorassay
s	Standardabweichung
T	Gesamtaktivität
Tg	Thyreoglobulin
V.K.	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	Mittelwert

1. Einleitung

Die Hypophyse ist Syntheseort zahlreicher Peptide mit hormoneller Wirkung, die größtenteils troper Natur sind (4). Neben anderen Hormonen werden hier auch das ACTH und das β -LPH synthetisiert. Diese beiden Peptide kommen in denselben Zellen der Hypophyse vor (2, 6, 11, 23, 28, 29, 32, 34, 35, 38) und haben einen gemeinsamen Precursor, durch dessen Spaltung sie entstehen (2, 6, 11, 23, 28, 29, 32, 35, 38). Das β -LPH besteht aus 91 Aminosäuren, deren Sequenz bekannt ist (4, 18, 20), jedoch gelang es bisher nicht, dieses Peptid synthetisch herzustellen. Außer dem β -LPH ist das γ -LPH bekannt, welches das N-terminale Ende des β -LPH beinhaltet, die Aminosäuresequenz (AS) 1 - 58 (4, 18, 20). Das β -MSH besteht aus den AS 41 - 58, also einem C-terminalen Bruchstück des γ -LPH (4, 18, 20). Die 31 c-terminalen Aminosäuren 61-91 des β -LPH sind als β -Endorphin bekannt (4, 16). Außer dem β -Endorphin existieren noch zwei weitere Endorphine, das α -Endorphin mit den AS 61 - 76 und das γ -Endorphin mit den AS 61 - 77 des β -LPH (4). Bei den β -Endorphinen handelt es sich um Neurohormone mit zentralnervöser Wirkung. Durch die Bindung an Opiat-Rezeptoren verfügen sie über analgetische Wirkungen.

Zur quantitativen Bestimmung der Endorphine ist ein biologischer Nachweis möglich. Dazu wird das Längsmuskel-Plexus-myentericus-Präparat des Meerschweinchens und der Samenleiter der Maus benutzt (15, 17, 18). Diese Präparate besitzen Opiat-Rezeptoren, welche in Abhängigkeit der Opiatkonzentration, eine elektrisch stimulierte Kontraktion hemmen. Dabei werden aber nicht nur Endorphine, sondern alle opiatartig wirkenden Substanzen erfaßt.

Im Radiorezeptorassay (RRA) werden Membranpräparationen aus Hirngewebe, welche Opiat-Rezeptoren besitzen, verwendet (10, 18, 30). Auch hier werden alle opiatartig wirkenden Substanzen mit Rezeptor-Affinität an die Membranen gebunden, sodaß auch diese Methode nicht spezifisch für ein bestimmtes Endorphin ist.

Im Radioimmunoassay (RIA) werden spezifische gegen eine als spezifisches Antigen wirkende Substanz gerichtete Antiseren eingesetzt. Es findet eine Konkurrenzreaktion zwischen radioaktiv markiertem und nicht markiertem Antigen um die Bindungsstelle an dem zugehörigen Antikörper statt. Ist der Antikörper spezifisch für das Antigen, so kann die Konzentration dieses Stoffes selektiv gemessen werden. Das β -Endorphin kann also quantitativ bestimmt werden, ohne daß das Vorhandensein anderer opiatartig wirksamer Stoffe die Messung wesentlich beeinflußt (18). Der Radioimmunoassay (RIA) wurde erstmals 1960 von BERSON und YALOW (41) für das Insulin angewandt und wird heute zur Bestimmung zahlreicher anderer Peptide und niedermolekularer Substanzen eingesetzt. Diese Methode ist nach bisherigen Untersuchungen die spezifischste und empfindlichste für die Messung von Endorphinen.

Ziel dieser Arbeit war es, das β -Endorphin radioimmunologisch zu bestimmen. Dazu waren notwendig:

1. Die Gewinnung spezifischer gegen das β -Endorphin gerichteter Antiseren.
2. Die radioaktive Markierung des β -Endorphin.
3. Ein geeignetes Verfahren das β -Endorphin aus dem Serum zu extrahieren, um Störfaktoren zu beseitigen, die eine direkte Messung im Serum verhinderten (27).

2. MATERIAL

- β -Endorphin, human, synthetisch, Peninsula, Laboratories, California, USA
- β -Endorphin, human, synthetisch, Serva, Heidelberg
- β -LPH, human aus Hypophysen extrahiert, zur Verfügung gestellt von C.H. Li über V. Höllt*
- β -LPH, vom Schwein aus Hypophysen extrahiert, zur Verfügung gestellt von V. Höllt*
- anti-p- β -LPH Antiserum von M. F. El Etreby*, Schering, Berlin
- α -Endorphin, human, synthetisch, Serva, Heidelberg
- γ -Endorphin, human, synthetisch, Serva, Heidelberg
- β -MSH
- ACTH Ciba-Geigy, Schweiz
- Thyreoglobulin, Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA
- N-Äthyl-N- (3 methylaminopropyl) Carbodiimid, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- Hydroxylamin, Sigma, München
- Freund's komplettes Adjuvans, Behringwerke AG, Marburg
- Thrombophob ad inj., Nordmark-Werke, Uetersen
- Na ¹²⁵J, Amersham-Buchler, Braunschweig

* Wir danken für die freundliche Überlassung der Präparate.

- Chloramin T, Merck, Darmstadt
- Natriummetabisulfit, Merck, Darmstadt
- Quso G 32, Philadelphia Quarz Company, USA
- Polyäthylenglykol 6000, Merck, Hohenbrunn
- Kaninchen- γ -Globulin, Serva, Heidelberg
- Anti-Kaninchen-Serum (Ziege), Paesel, Frankfurt
- Trasylol, Bayer, Leverkusen
- Kieselgel 60, Korngröße 0,063 - 0,200 mm, Merck, Darmstadt
- Rinderserumalbumin, Roth, Karlsruhe
- SP-Sephadex C-25, Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Schweden
- Aqua bidest.

Puffer und Lösungen:

- Elutionsmittel:

400 ml Aceton + 10 ml Essigsäure + 590 ml Aqua bidest

- 0,1 m Glycin-HCl Puffer, pH 3
- 0,5 m Phosphatpuffer, pH 7,5
- 1/15 m Phosphatpuffer, pH 7,4

- Markierungspuffer:

90 g NaCl + 21 g $\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 2 g NaN_3 + 20 g Rinderserumalbumin + 18,6 g EDTA werden in 10 l Aqua bidest. gelöst. In 1 l dieser Stammlösung werden 40 g Rinderserumalbumin gelöst, 400 000 K. I. E. Trasylol zugegeben, und der pH-Wert wird mit 0,1 n HCl auf 7,4 eingestellt.

- Puffer-Stammlösung:

9,8 g Natriumbarbitat, 6,48 g Natriumacetat, 51 g Natriumchlorid und 2 g Natriumazid werden in 2 l Aqua bidest. aufgelöst.

- Puffer A:

Die Puffer Stammlösung wird mit Aqua bidest. 1 : 10 verdünnt und mit 0,1 n HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt.

- Puffer B = Assay-Puffer:

10 g Rinderserumalbumin werden in 1 l Puffer A gelöst und 25 ml Trasylol (= 500 000 K. I. E.) zugegeben.

Geräte:

- Whirlmix, Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge, Schultheis, München
- γ -Zählgerät, Nuclear Enterprises, Schottland
- Kühlzentrifuge, Biotronic, Frankfurt
- Wasserstrahlpumpe
- Vibrationsschüttler: Vortex-Evaporator, Buchler, New Jersey, USA
- Gefriertrockner, Cenco, Hamm

3. ANTISERUMGEWINNUNG

3.1. Methodik

3.1.1. Antigenherstellung

Wegen des geringen Molekulargewichts des β -Endorphins von ca. 3500 und der deshalb zu erwartenden geringen Antigenität (10, 19), wurde das Hormon zur Immunisierung von Kaninchen an eine Trägersubstanz gekoppelt. Das β -Endorphin kann z.B. an bovines Serumalbumin (12, 39) oder auch an Thyreoglobulin (Tg) (33) gekoppelt werden. Die Verwendung von Thyreoglobulin als Trägerprotein hat sich zur Erhöhung der Antigenität anderer niedermolekularer Substanzen mit guten Erfolgen bewährt (3, 22, 31, 33). Das Thyreoglobulin ist ein in der Schilddrüse produziertes Glykoprotein, welches 125 Tyrosinreste enthält und ein Molekulargewicht von ca. 650 000 hat.

Zur Koppelung des β -Endorphins an Tg wurde die Carbodiimid-Reaktion durchgeführt, die auch zur Koppelung anderer Peptide an Trägerproteine verwendet wurde (21, 22, 33). In Anwesenheit des Carbodiimid (CDI) kommt es zu einer stabilen Peptidbindung zwischen Amino- und aktivierten Carboxylgruppen. Dabei entsteht das gewünschte Syntheseprodukt, nämlich an Tg gekoppeltes β -Endorphin und ein Harnstoffderivat.

Da sich aus dem aromatischen Ring des Tyrosins in Anwesenheit von CDI O-aryl-Isoharnstoff oder N-aryl-Harnstoff bilden könnte (31), und das β -Endorphin in den Positionen 61 und 87 Tyrosinreste besitzt, wird dem Reaktionsgemisch Hydroxylamin ($\text{H}_2\text{N} - \text{OH}$) zugegeben,

welches das überschüssige CDI zerstört, sodaß die Veränderung der Tyrosinreste verhindert wird.

Durchführung:

15 mg Tg sowie 2,4 mg β -Endorphin werden in 450 μ l Aqua bidest. aufgelöst. Durch die Zugabe von 150 μ l CDI-Lösung (23 mg CDI in 5 ml Aqua bidest.) wird die Reaktion gestartet. Dieser Ansatz wird 18 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird nach Zugabe von 600 μ l 1 m Hydroxylamin-Lösung weitere 5 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Konjugat wurde in 4 Portionen a 300 μ l aufgeteilt. Eine Portion wurde jeweils zu einer Immunisierung verwendet, die übrigen wurden bis zur Verwertung bei -20°C eingefroren.

3.1.2. Immunisierung der Kaninchen

Herstellung des fertigen Impfstoffes:

300 μ l des Konjugats wurden zusammen mit 300 μ l isotoner Kochsalzlösung und 600 μ l komplettem Freund'schem Adjuvans in eine 2 ml Spritze aufgezogen und gut durchmischt. Das komplette Freund'sche Adjuvans enthält Tuberkulose-Impfstoff in einer öligen Lösung. Der Impfstoff bewirkt eine zusätzliche Stimulation des Immunsystems, sodaß die Antikörperbildung gesteigert wird. Durch die ölige Emulsion wird die Resorption des Konjugats begünstigt.

Applikation des Impfstoffes:

Zur Applikation von Antigengemischen eignen sich intradermale Injektionen geringer Antigenmengen an möglichst vielen Stellen des Rückens paravertebral (36). Auf diese Weise werden eine relativ

große Zahl von Lymphbahnen und den dazugehörigen Lymphknoten von dem Antigen erreicht. Die Antigenlösung wurde auf 6 Kaninchen verteilt. Da nicht alle Kaninchen bis zum Schluß überlebten, bekamen die letzten Kaninchen bei den späteren Boosterungen eine entsprechend größere Menge des Antigens appliziert. Ca. 10 Tage nach den Boosterungen wurde den Kaninchen Blut aus der lateralen Ohrvene abgenommen. Es wurde in Reagenzgläser, die einige Tropfen Thrombophop enthielten, gefüllt und anschließend 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Das Plasma wurde in Portionen a 1 ml portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Boosterungen erfolgten im Abstand von ca. 4 Wochen (s. Tabelle 1). Nach den ersten vier Immunisierungen wurde eine Pause von ca. 10 Monaten eingelegt. (Diese Versuche wurden zusammen mit G. Kleber durchgeführt). Danach erfolgten 4 weitere Boosterungen. Nach einer zweiten Immunisierungspause von 3 Monaten wurden nochmals 3 Boosterungen durchgeführt. Die verbliebenen letzten zwei Tiere wurden nach einer dritten Immunisierungspause von 4 Monaten nochmals geboostert, danach wurde eines entblutet, und das letzte Tier wurde nach einer letzten Boosterung auch entblutet, da ein zufriedenstellender Antikörpertiter erreicht war.

	Datum der Boosterungen	Zahl der Kaninchen	Datum der Blutentnahmen	Wochen nach der Erstimmunisierung
1)	04.08.1978	6		
2)	25.08.1978	6	1) 01.09.1978	7
3)	19.09.1978	6	2) 28.09.1978	11
4)	27.07.1979	4	3) 06.08.1979	55
5)	29.08.1979	3	4) 07.09.1979	60
6)	25.09.1979	3	5) 04.10.1979	64
7)	22.10.1979	3	6) 31.10.1979	68
8)	16.01.1980	2	7) 28.01.1980	80
9)	11.02.1980	2	8) 20.02.1980	84
10)	12.03.1980	2	9) 21.03.1980	88
11)	29.07.1980	2	10) 11.08.1980	108
12)	14.08.1980	1	11) 25.08.1980	110

Tabelle 1: Zeitplan der Boosterungen und Blutentnahmen
Erstimmunisierung der 6 Kaninchen am 17.07.1978

3.2. Ergebnisse

Um den Titer der Antiseren zu bestimmen, wurden Bo-Werte der Antiseren, d.i. die Bindung des Antiserums an das radioaktiv markierte Antigen in Abwesenheit von nicht markierten "kaltem" Antigen, erstellt. Dazu wurden die Antiseren in einer geometrischen Verdünnungsreihe von 1 : 500 bis 1 : 64 000 eingesetzt.

Als AK-Titer wurde die Verdünnung bezeichnet, die abzüglich der unspezifischen Bindung N 30 % der Gesamtaktivität des eingesetzten Tracers gebunden hat, also die Verdünnung in der das Antiserum im RIA eingesetzt wurde (s. 5.4.1.1.). Die Abbildung 1 zeigt den Ak-Titerverlauf.

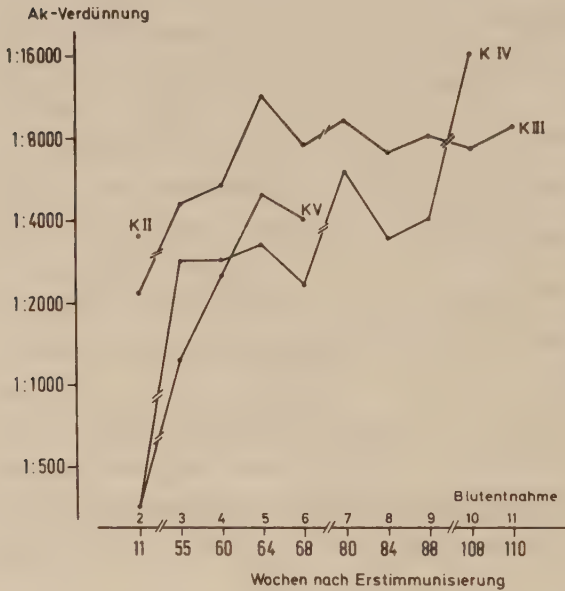


Abb. 1: Ak-Titer im Laufe der Blutentnahmen

Die Kaninchen K I und K VI zeigten keine Ak-Bildung.

4. RADIOAKTIVE MARKIERUNG

4.1. Prinzip der Markierung

Zur radioaktiven Markierung wurde die Chloramin T - Methode von HUNTER und GREENWOOD (16), modifiziert nach BERSON und YALOW (43) angewandt. Sie beruht darauf, daß Jodid durch die Zugabe des Oxidationsmittels Chloramin T zu Jodoniumionen oxidiert wird, welche in die Tyrosinreste des β -Endorphins eingebaut werden können. Die überschüssigen Jodoniumionen werden anschließend durch Zugabe des Reduktionsmittels Natriummetabisulfit wieder reduziert, was zu einem Abbruch der Reaktion führt. Zur Verhinderung der Adsorption des β -Endorphins an die Gefäßwand wird Nullserum zugegeben (1, 42, 43).

Da in dem markierten Tracer auch noch freies nicht an das β -Endorphin gebundenes radioaktives Jod enthalten ist, muß eine Reinigung, d.h. Entsalzung durchgeführt werden. Dazu wurde eine Extraktion mit Quso G 32 vorgenommen (1, 43). Quso besteht aus mikrofeinen präzipitierten Silikatgranula, welche aus Si O_2 - Gruppen aufgebaut sind, und deren Oberfläche mit Silanolgruppen bedeckt ist. Diese Granula besitzen eine hohe Adsorptionsfähigkeit für das β -Endorphin, nicht aber für das ungebundene Jod. Es wird also das markierte β -Endorphin an das Quso adsorbiert und anschließend mit einem Elutionsmittel wieder eluiert.

4.2. Methodik

Das Jod war in 0,5 m Phosphatpuffer so gelöst, daß 150 μl einer Aktivität von 5 mCi entsprachen. Das β -Endorphin lag in einer

Konzentration von 1µg/10µl vor, gelöst in Puffer B (siehe 2.).
25 mg Chloramin T und 25 mg Natriummetabisulfit wurden jeweils unmittelbar vor der Markierung in 8 ml 1/15 m Phosphatpuffer gelöst.

Markierungsvorgang:

20 µl Na ¹²⁵ ≙ 0,7 mCi	in Spitzröhrchen pipettieren	Oxidation
5 µl β-Endorphin ≙ 0,5 µg		
10 µl Chloramin T		
	3 - 5 sec schütteln	
20 µl Natrium- metabisulfit	schütteln	Reduktion
1 ml Nullserum		Verhinderung der Wandadsorption

Reinigungsvorgang:

Der ganze Ansatz wird in ein 5 mg Quso enthaltendes verschließbares Eppendorfgefäß überpipettiert

	1 min schütteln	Adsorption
	1/2 min zentrifugieren	
	Überstand verwerfen	
1 ml Aquadest	Quso-Sediment aufschütteln	

	1/2 min zentrifugieren	Nachwaschen
	Überstand verwerfen	
300 µl Elutionsmittel	2 min schütteln	Elution
	2 min zentrifugieren	

Der Überstand wird in ein Gefäß mit 10 ml Markierungspuffer (s.o.) überpipetiert. Der markierte und gereinigte Tracer wurde mit dem Assay-Puffer (s.o.) auf $5 - 6 \cdot 10^4$ cpm/100 µl vorverdünnt und in Portionen à 1 ml bei -20°C tiefgefroren. Zum Gebrauch wurde der Tracer auf ca. 10 000 cpm/100 µl mit Assay-Puffer weiterverdünnt.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Überprüfung der Qualität des Tracers

Um festzustellen, ob der markierte Tracer verwertbar ist, wurde die Höhe der Bindung des Tracers an das Antiserum und die Verdrängung durch eine hohe "kalte" β -Endorphin-Standard-Konzentration (s. 5.1.) ausgetestet. Dazu wurden Dreifachwerte wie folgt angesetzt:

	Maximalbindung	Verdrängung	unspezifische Bindung
Nullserum	100 µl	-	100 µl
Standardkonzentration (5 ng/ml)	-	100 µl	-
Antiserum	100 µl	100 µl	-

Assay-Puffer	-	-	100 μ l
Tracer (10 000 cpm/ 100 μ l)	100 μ l	100 μ l	100 μ l

Dieser Ansatz wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 4°C getrennt (siehe 5.4.1.3.). Wenn unter diesen Bedingungen abzüglich der unspezifischen Bindung N mindestens 30 % der eingesetzten Gesamtaktivität an das Antiserum gebunden waren, und die Verdrängung des Tracers vom Antikörper durch das kalte Hormon entsprechender Konzentration mindestens 50 % betrug, konnte der Tracer verwendet werden, ansonsten mußte neu markiert werden.

4.3.2. Haltbarkeit des Tracers

Der Tracer wurde, wie schon in 4.2. erwähnt, auf ca. $5 - 6 \cdot 10^4$ cpm/100 μ l vorverdünnt und bei - 20°C aufbewahrt. So verminderte sich zwar die Bindung des Tracers an das Antiserum innerhalb von 4 Wochen von ca. 35 % auf 30 %, jedoch lag die Empfindlichkeit und Steilheit im Bereich der statistischen Streubreite. Der Tracer konnte also ohne weiteres 4 - 5 Wochen verwendet werden.

4.3.3. Spezifische Aktivität des Tracers

Die spezifische Aktivität des Tracers wird in mCi/mg β -Endorphin angegeben. Die Aktivitätsmenge, die an das β -Endorphin gebunden ist, entspricht der Quso-Adsorption. Die Aktivität des Quso-Sediments nach der Elution entspricht dem markierten β -Endorphin, das

nicht vom Quso eluiert werden konnte. Wir erhielten bezüglich einer insgesamt eingesetzten Gesamtaktivität von 0,7 mCi folgende Relationen:

	Aktivität in Prozent der Gesamtaktivität		
Gesamtaktivität	100 %	$\hat{=}$	0,7 mCi
Quso-Adsorption	19,5 %	$\hat{=}$	0,14 mCi
Quso-Sediment	1,6 %	$\hat{=}$	0,011 mCi

Unter der Voraussetzung, daß alles eingesetzte β -Endorphin, also 0,5 μg markiert wurde, wurden also 0,5 μg β -Endorphin mit 0,14 mCi ^{125}J markiert. Daraus läßt sich die spezifische Aktivität des Tracers zu ca. 260 mCi/mg β -Endorphin errechnen. Da nicht alles markierte β -Endorphin vom Quso wieder eluiert werden konnte, befanden sich im gesamten markierten Tracer noch 0,46 μg β -Endorphin. In der Endverdünnung, die im Assay eingesetzt wurde, entsprach das einer Menge von ca. 100 pg markiertem β -Endorphin in 100 μl Tracer.

5. RADIOIMMUNOASSAY

5.1. Prinzip des Radioimmunoassay

Das Prinzip des Radioimmunoassay beruht auf einer Konkurrenzreaktion zwischen einem radioaktiv markierten und unmarkierten Antigen um die Bindungsstelle an ihrem spezifischen Antikörper (7).

Ist die Konzentration des markierten Antigens und des Antikörpers konstant, so nimmt die Radioaktivität des Antigen - Antikörperkomplexes mit zunehmender Konzentration des nicht markierten Antigens ab. Ohne "kaltes", d.i. nicht markiertes Antigen, ist die Aktivität der Antigen-Antikörper-Komplexe maximal, sie entspricht dem Nullwert (B_0). Zur Messung des Antikörpergebundenen Antigens muß das freie, nicht gebundene Antigen abgetrennt werden. Dazu eignet sich ein zweiter präzipitierender Antikörper (speziespezifisch), der gegen den ersten Antikörper (antigenspezifisch) gerichtet ist. Zur Erstellung eines Eichsystems wird "kaltes" Hormon in bekannten Konzentrationen eingesetzt.

5.2. Nullserum

Für den RIA wurde β -Endorphinfreies Serum benötigt. Dazu wurde die Adsorptionsfähigkeit des β -Endorphins an Quiso ausgenutzt. Es wurde ein Pool von Seren einer großen Zahl beliebiger Patienten gebildet, und dieses Serum wurde mit Quiso ausgeschüttelt. Quiso wurde ins Serum gegeben, 5 min gerührt und 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend noch filtriert. Um die Proteasen zu inaktivieren, wurde dem so gewonnenen Nullserum Trasylol zugegeben.

5.3. Standardverdünnungen

Das als Trockensubstanz vorgelegene β -Endorphin wurde im ASSAY-Puffer aufgelöst, sodaß es in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ vorlag. Diese Standardkonzentration wurde in Portionen a $20 \mu\text{l}$ in verschließbaren Eppendorfgläsern bei -20°C aufbewahrt. Für die Erstellung von Eichkurven wurde dieser Standard mit Nullserum bzw. Assay-Puffer auf 20 ng/ml weiterverdünnt und von dieser Konzentration eine geometrische Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 bis zu einer Konzentration von $0,04 \text{ ng/ml}$ erstellt.

5.4. Vorversuche und Methoden

5.4.1. Kinetikstudien

5.4.1.1. Tracerbindung

Da für die Empfindlichkeit einer Eichkurve vor allem die richtige Wahl der Antiserumverdünnung eine wesentliche Rolle spielt (7, 8), ist es notwendig, die optimale Verdünnung anhand einer Bindungskurve auszutesten. In vielen RIA's wird die Antiserumkonzentration so gewählt, daß das Antiserum in Abwesenheit von kaltem Antigen (das entspricht dem Nullpunkt B_0) ca. 50 % der Gesamtaktivität des eingesetzten Tracers bindet. Eine höhere Meßempfindlichkeit kann jedoch erreicht werden, wenn das Antiserum stärker verdünnt wird, sodaß nur noch etwa 30 % der Gesamtaktivität des eingesetzten Tracers gebunden wird (7, 8). Es wurden anhand von Bindungskurven die Antiserumverdünnungen ermittelt, bei denen abzüglich der unspezifischen Bindung (N) 30 % der Traceraktivität gebunden wird. Dazu wurden B_0 -Werte angesetzt, wobei die Antiseren in geometrischen Verdünnungsreihen von 1 : 500 bis 1 : 64 000 eingesetzt

wurden. Die optimale Verdünnung für eines der Antiseren, bei der die Bindung $B_0-N/T \cdot 100\%$ ca. 30 % beträgt, kann man auf der Abbildung 2 bei ca. 1 : 5 000 ablesen.

$B_0-N/T \cdot 100 [\%]$

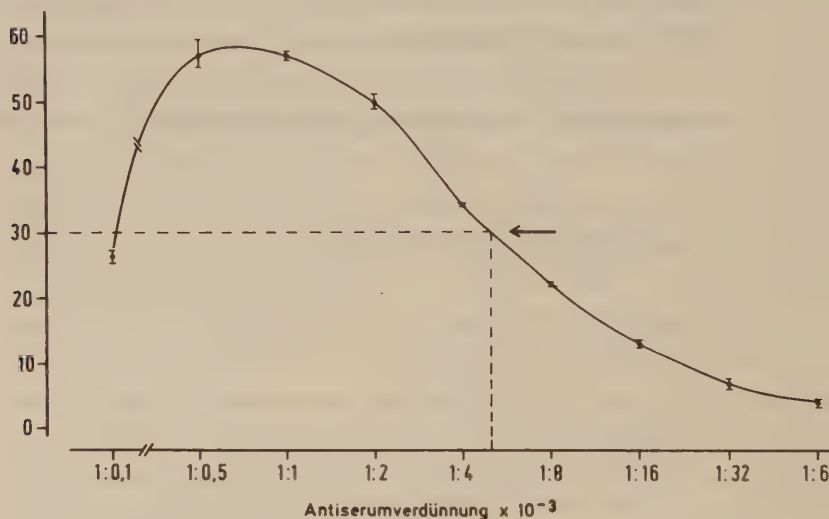


Abb. 2: Antikörperverdünnungskurve

Anhand von Eichkurven, bei denen verschiedene Antiserumverdünnungen eingesetzt wurden, wurde ausgetestet, welches bezüglich der Empfindlichkeit die optimale Verdünnung ist. Dazu wurden Verdünnungen des obigen Antiserums von 1 : 2 000, 1 : 4 000 und 1 : 8 000 eingesetzt.

Antiserum- verdünnung	$\frac{B_0-N}{T} \cdot 100 \%$	50%-Intercept in ng/ml	untere Nachweis- grenze in ng/ml
1 : 2 000	47,5	1,493	0,078
1 : 4 000	29,7	0,795	0,016
1 : 8 000	16,3	0,558	0,129

Die Abb. 3 zeigt die drei Eichkurven. Die Eichkurve, bei der eine Verdünnung des Antiserums eingesetzt wurde, die ca. 30 % Tracerbindung erreichte, war die Empfindlichste. Zwar war bei einer stärkeren Verdünnung der 50 % Intercept, welcher ein Maß für die Steilheit der Kurven ist, etwas niedriger, die untere Nachweisgrenze war aber viel höher, sodaß weiterhin die Antiseren in einer Verdünnung, die ca. 30 % Tracerbindung besitzen, eingesetzt wurden.

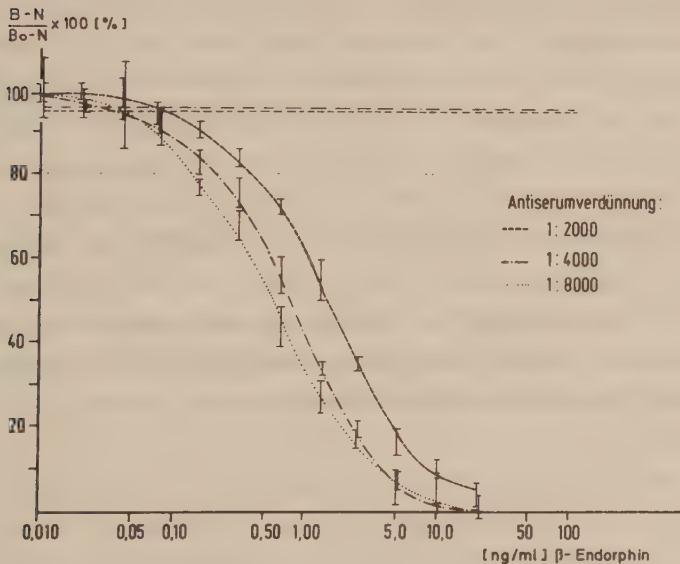


Abb. 3: Eichkurven bei Verwendung verschiedener Antiserum-
verdünnungen

5.4.1.2. Inkubationszeiten

Einen vergleichbaren Einfluß auf die Empfindlichkeit der Eichkurve wie die Antiserumverdünnung hat die Wahl der Inkubationszeiten (7, 8). Eine "kalte Vorinkubation" nennt man die vorausgehende Inkubation des Standards mit dem Antiserum ohne Tracer, gegenüber der "heißen Inkubation", welche der Tracerinkubation entspricht. Es bestehen in der Literatur unterschiedliche Meinungen darüber, ob durch eine "kalte Vorinkubation" die Empfindlichkeit einer RIA-Eichkurve verbessert wird (7). Dies war bei uns der Fall.

Die Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß sich möglichst ein Gleichgewicht der Reaktion einstellen konnte. Um festzustellen, nach welcher Zeit das Gleichgewicht der Antigen-Antikörper-Reaktion erreicht war, wurde eine Kinetik erstellt. Dazu wurden B_0 -Werte und N-Werte angesetzt, und die Proben wurden nach verschiedenen langen Inkubationszeiten getrennt. Aus der Abb. 4 kann man entnehmen, daß sich das Gleichgewicht nach ca. 24 Stunden eingestellt hat, und keine wesentliche Reaktion mehr stattfindet. Dementsprechend wurden die Inkubationszeiten so gewählt, daß sowohl während der kalten Vorinkubation als auch während der heißen Inkubation die Reaktion in etwa vollständig ablaufen kann. Es wurde im RIA 24 Stunden bei 4°C kalt vorinkubiert und nach Zugabe des Tracers weitere 24 Stunden heiß inkubiert. Eine Verlängerung der kalten Vorinkubation erbrachte keine Verbesserung der Empfindlichkeit.

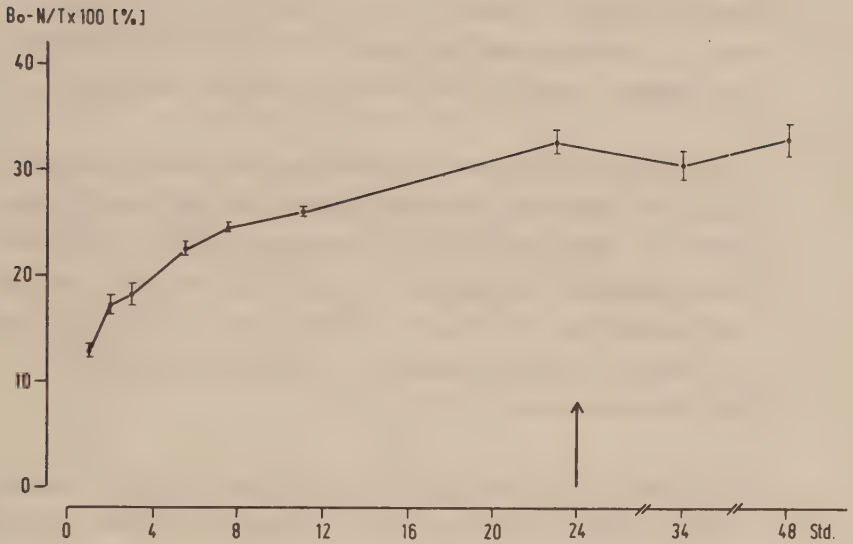


Abb. 4: Tracerkinetik des Antiserum

5.4.1.3. Trennung mit Hilfe der optimierten Doppelantikörpertechnik

Zur Trennung der Proben wurde eine optimierte Doppelantikörpertechnik angewandt (40). Dabei wird den Proben ein zweites Antiserum zugegeben, welches gegen das erste Antiserum gerichtet ist und die Antigen-Antikörper-Komplexe fällt. Zur Optimierung wird außerdem eine 6 %ige PEG-Lösung zugegeben, die Kaninchen- γ -Globulin enthält. Diese bewirkt eine bessere und schnellere Fällung der Komplexe (40), reicht aber alleine ohne zweites Antiserum nicht zur Fällung aus.

Die Trennung erfolgte durch Zugabe von 50 μ l des zweiten Antiserums (verdünnt mit Assay-Puffer) und 500 μ l PEG-Lösung (hergestellt mit Puffer A, enthält 14 μ g/ml Kaninchen- γ -Globulin). Nach 5 - 10 min wurden die Proben 15 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Für die Trennung mußte die Verdünnung und die Inkubationskinetik des zweiten Antiserums ausgetestet werden. Für die Kinetik wurde den Proben jeweils 50 μ l zweites Antiserum und 500 μ l 6 %ige PEG-Lösung zugegeben, und nach 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min erfolgte die Trennung durch Zentrifugieren. Bereits nach 5 min war die Reaktion praktisch vollständig abgelaufen, eine Inkubation von 5 min reicht also völlig aus.

Zur Austestung der Verdünnung des 2. Antiserums wurde dieses in Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 320 eingesetzt, außerdem wurde die 6 %ige PEG-Lösung alleine eingesetzt. Die Abb. 5 zeigt, daß die Fällung bei einer Verdünnung des Antiserums zwischen 1 : 10 und 1 : 80 konstant bleibt. Erst bei Verdünnungen, die größer als 1 : 80 sind, fallen die gemessenen Werte signifikant ab. Außerdem ist auf der Abb. 5 zu sehen, daß die 6 %ige PEG-Lösung alleine zur Fällung nicht ausreicht. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Verdünnung des zweiten Antiserums bei 1 : 40 gewählt, da sich hier die Kurve im Plateau befindet, und möglichst wenig von dem zweiten Antiserum verbraucht wird.

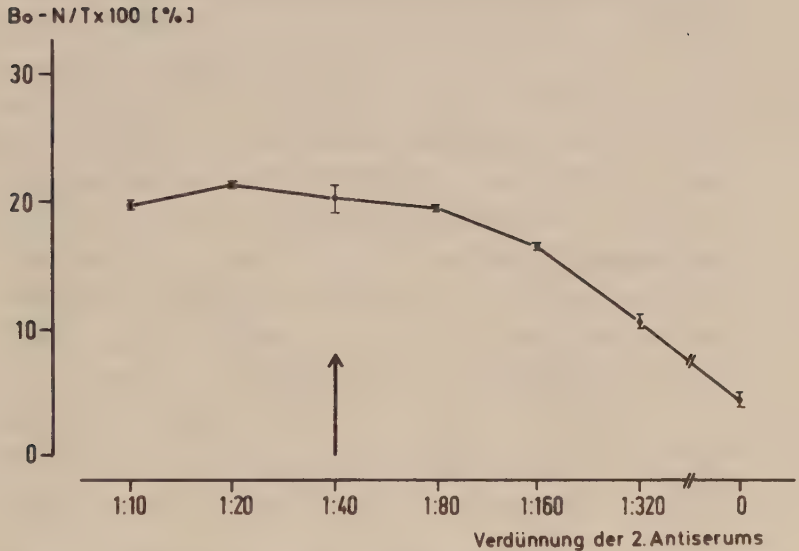


Abb. 5: Verdünnungskurve des zweiten Antiserums

Endgültiger Probenansatz zur Trennung:

+ 50 μ l zweites Antiserum, 1 : 40

+ 500 μ l 6 %ige PEG-Lösung

5 - 10 min bei 20°C inkubieren

15 min bei 4°C zentrifugieren

Überstand mit der Wasserstrahlpumpe absaugen.

5.4.2. Auswertung der Eichkurve

Die Proben wurden in einem 16-kanal- γ -Zählgerät 2 min gezählt und die Ergebnisse in einer EDV-Anlage mittels der "Spline-

Approximation" ausgewertet. Die "Spline-Funktion" ist ein mathematisches Verfahren, wobei aus den experimentell ermittelten Zählraten versucht wird, einen möglichst glatten Kurvenzug zu erreichen (24, 25).

Bei der graphischen Darstellung wurde auf der Abszisse die Konzentration in ng/ml aufgetragen, auf der Ordinate der Anteil der gebundenen Aktivität ($\text{Bound} = B$) in Prozent der maximal gebundenen Aktivität B_0 . Die unspezifisch gebundene Aktivität N wird von jedem Wert abgezogen, sodaß man $(B - N) / (B_0 - N) \cdot 100$ erhält. Es werden außerdem die Standardabweichungen der Dreifachwerte der Eichkurvenpunkte angegeben, die untere Nachweisgrenze und der 50 % Intercept. Die untere Nachweisgrenze entspricht der geringsten Konzentration, die noch an der Kurve abgelesen werden kann. Der 50 % Intercept entspricht der Konzentration, bei der 50 % der Aktivität gebunden werden. Er ist ein Maß für die Steilheit der Kurve.

5.4.3. Vergleich von Serum- und Puffereichkurve

Da Extraktionsverfahren in der Regel sehr zeit- und arbeitsaufwendig sind, wurde überprüft, ob die Antiseren evtl. zur direkten β -Endorphin-Bestimmung im Serum geeignet sind. Zum Vergleich wurden zwei Eichkurven erstellt, und zwar wurde der β -Endorphinstandard einmal in β -Endorphinfreiem Nullserum und für die zweite Eichkurve im Assay-Puffer gelöst. Sind diese beiden Kurven sowohl bezüglich des Verlaufs, als auch der maximalen Bindung B_0 unterschiedlich, so befinden sich im Serum Störfaktoren, die die Messungen beeinflussen, und durch ein Extraktionsverfahren beseitigt werden müssen. Die beiden Eichkurven zeigten einen so unterschiedlichen Verlauf (s. Abb. 6), daß die wiedergefundenen Werte nicht übereinstimmen konnten. Es

wurden in der Serumeichkurve im niedrigen Konzentrationsbereich niedrigere Werte gemessen und im hohen Konzentrationsbereich höhere Werte, als in der Puffereichkurve. Außerdem war die maximal gebundene Aktivität in der Serumeichkurve um ca. 4 % höher als in der Puffereichkurve.

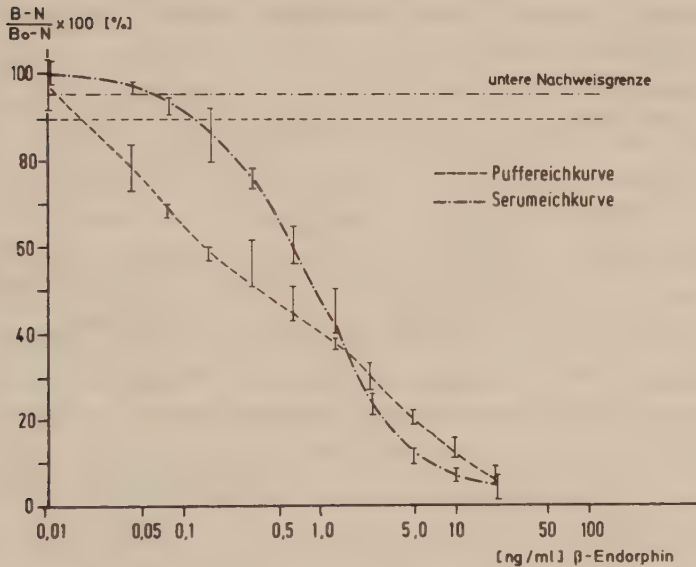


Abb. 6: Standardeichkurven in Nullserum und in Assay-Puffer

Aus diesem Ergebnis läßt sich der Schluß ziehen, daß im Serum entweder Proteine vorhanden sind, die mit dem β -Endorphin eine Bindung eingehen, oder anderweitige Störfaktoren im Serum vorliegen, die die Bindung des β -Endorphins an den Antikörper beeinflussen. Solche Bindungen an hochmolekulare Serumproteine wurden von ORF et al. beschrieben (27).

5.4.4. β -Endorphin-RIA

Es wurde prinzipiell mit Dreifachwerten gearbeitet. Zur Messung der Bo-Werte wurden Sechsfachwerte eingesetzt. Dabei wurde nach folgendem Pipettier- und Inkubationsschema vorgegangen:

	Bo-Werte	Standard-Kurvenpunkte	unspezifische Bindung N	Gesamtaktivität
Nullserum	100 μ l	-	100 μ l	-
Standard-Verdünnungen (s. 5.3.2.)	-	100 μ l	-	-
Antiserum (1 : 4000)	100 μ l	100 μ l	-	-
Assay-Puffer	-	-	100 μ l	-
24 Stunden bei 4°C kalt vorinkubieren				
Tracer	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
24 Stunden heiße Inkubation bei 4°C				
2. Antiserum (1 : 40)	50 μ l	50 μ l	50 μ l	-
6 % PEG-Lösung	500 μ l	500 μ l	500 μ l	-

Nach einer Inkubationszeit von 5 - 10 min erfolgt die Trennung durch 15 min zentrifugieren bei 4°C. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und der Niederschlag in einem 16-Kanal-Zählgerät gezählt. Die Zählraten werden auf einen Lochstreifen gestanzt und mit Hilfe der EDV ausgewertet (s. 5.4.2.).

5.5. Ergebnisse

5.5.1. Unterschiedliche Standardpräparate

Die von uns verwendeten Standardpräparate waren synthetisch hergestellte Peptide mit der bekannten AS-Sequenz des humanen β -Endorphins, des C-terminalen Endes des humanen β -LPH (AS 61-91). Wir hatten ein solches Präparat von der Fa. Serva aus Heidelberg bezogen und eines von der Fa. Peninsula Laboratories aus Californien. Dr. Wood immunisierte zuerst Kaninchen mit dem Standard der Firma Serva (Antiseren R 9,3 und R 10,3) und später wurden Antiseren mit dem Standard der Fa. Peninsula (Antiseren K I - K VI) gewonnen. Die gewonnenen Antiseren wurden beide mit dem zugehörigen Peptid im RIA eingesetzt, außerdem mit dem jeweils anderen Peptid. Das Ergebnis ist in Abb. 7 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß diese beiden Substanzen offensichtlich nicht identisch sind, vielleicht eine unterschiedliche sterische Struktur besitzen, die bewirkt, daß das Peninsula-Antigen mit dem gegen das Serva-Antigen gerichteten Antiserum überhaupt nicht reagiert und das Serva-Antigen mit dem gegen das Peninsula-Antigen gerichteten Antiseren nur zu ca. 10 %. Dies wirft natürlich die Frage auf, welche der beiden Substanzen dem beim Menschen vorkommenden β -Endorphin ähnlicher ist.

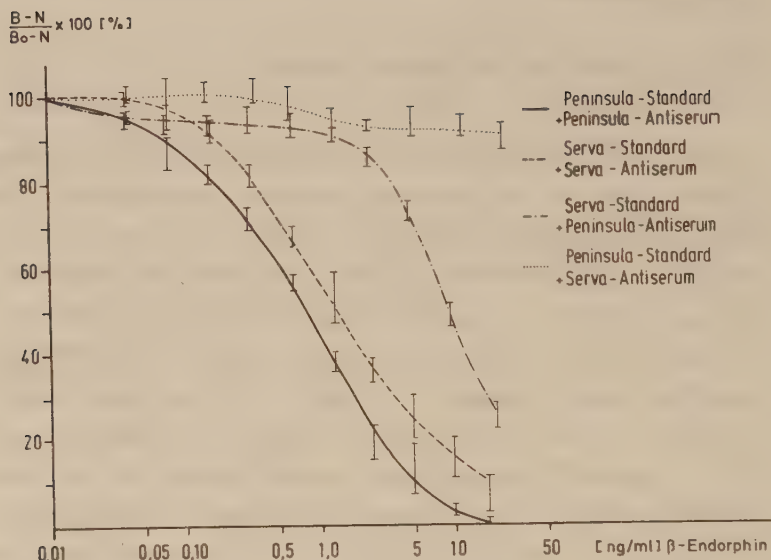


Abb. 7: Standardkurven mit den verschiedenen Standardpräparaten
und dem jeweils zugehörigen Antiserum sowie dem anderen
Antiserum

Serva-Antiserum R 9 1 : 8 000

Peninsula-Antiserum K V 1 : 4 000

M. Sofroniew führte mit diesen beiden Antiseren und der jeweils dazugehörigen Substanz immunhistochemische Versuche durch (32). Dabei kam er zu demselben oben dargestellten Ergebnis, daß die beiden Substanzen offensichtlich nicht oder nur wenig miteinander reagieren. Außerdem wies er immunhistochemisch nach, daß beide Antiseren an das in Rattenhypophysen vorkommende endogene β -Endorphin gebunden werden, das gegen das Serva-Peptid gerichtete Antiserum wurde jedoch etwas besser gebunden.

5.5.2. Kreuzreaktivität gegenüber anderen Hormonen

Um festzustellen, ob ein Stoff mit einem anderen kreuzreagiert, wird er in einer bekannten Konzentration im RIA eingesetzt. Aus dem gemessenen Wert läßt sich, bezogen auf die eingesetzte Menge, die Kreuzreaktion in Prozent errechnen. Zur Beurteilung der gemessenen Werte einer Substanz ist es wichtig, die Spezifität des verwendeten Antiserums zu kennen.

Es wurde die Kreuzaktivität gegenüber ACTH, β -MSH, α -Endorphin, γ -Endorphin und β -LPH, sowohl im homologen Serva- (R 9,3 - s. 5.5.1.) als auch Peninsula-RIA (Antiserum K V, 6 - s. Abb. 1), bestimmt.

Kreuzaktivität in Prozent

β -Endorphin	100
ACTH	< 0,01
β -MSH	< 0,01
α -Endorphin	< 0,01
γ -Endorphin	< 0,01
β -LPH	15 bzw. 50 (s.u.)

Die β -Endorphin-Antiseren reagierten nur mit dem β -LPH-Standard, was aufgrund der Gemeinsamkeiten der Peptide zu erwarten war. Erstaunlich aber ist, daß die Kreuzreaktivität der jeweiligen Antiseren gegenüber dem β -LPH für die beiden verschiedenen β -Endorphin-Standards unterschiedlich war. Im Serva-System betrug sie 50 %, im Peninsula-System dagegen nur 15 %.

Um diese Fehlerquelle bei der quantitativen Bestimmung des β -Endorphins zu beseitigen, wäre es notwendig, auch das β -LPH einer Serum-

probe selektiv zu bestimmen, oder durch Chromatographie vor der Bestimmung abzutrennen.

5.6. Versuch zur Bestimmung des humanen β -LPH

Da das humane β -LPH noch nicht synthetisch hergestellt werden kann, steht es nur in sehr geringen Mengen aus Hypophysenextrakten zur Verfügung. Da menschliche Hypophysen zur Extraktion nur selten vorhanden sind, ist es schwierig, so große Mengen zu bekommen, die zur Immunisierung von Tieren zur Antiserumgewinnung ausreichen. Einfacher dagegen ist es, Schweinehypophysen zu bekommen, aus denen das Schweine- β -LPH (p- β -LPH) extrahiert werden kann. Damit hat Maurice P. Dubois* Kaninchen immunisiert und ein Antiserum gewonnen, das uns freundlicherweise von M. F. El Etreby*, Fa. Schering, Berlin zur Verfügung gestellt wurde.

Das p- β -LPH hat nicht genau dieselbe AS-Sequenz wie das h- β -LPH. Gegen das p- β -LPH gerichtete Antiseren sind zur heterologen Bestimmung nur dann geeignet, wenn sie in genügendem Ausmaß auch mit dem h- β -LPH reagieren. Um dies festzustellen, wurde ein RIA zur Bestimmung des p- β -LPH aufgebaut, und darin die Kreuzreaktivität gegenüber dem h- β -LPH getestet.

5.6.1. Tracerherstellung

Die Markierung des p- β -LPH wurde ebenso wie die des β -Endorphins mit der Chloramin T-Methode durchgeführt (s. 4.1.). Die Reinigung

✕

Wir danken für die Überlassung der Materialien.

erfolgte durch säulenchromatographische Trennung auf einer SP Sephadex C-25 Säule. Es wurden 2 μg p- β -LPH mit 0,7 mCi ^{125}J markiert. Das p- β -LPH lag in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ vor, sodaß 20 μl verwendet wurden. Der Markierungsvorgang entsprach genau dem des β -Endorphins (s. 4.2.).

Die Reinigung mit Hilfe der SP-Sephadex C-25 Säule beruht auf dem Prinzip eines Kationenaustauschers. Da Peptide im sauren Milieu als Kationen vorliegen, wird das Gemisch, das den markierten Tracer und das überschüssige als Anion vorliegende Jodid enthält, auf die Säule aufgetragen und mit saurem Puffer eluiert. Nur das als Kation vorliegende Hormon adsorbiert an das Gel. Durch Umpuffern auf einen neutralen pH-Wert kann das markierte Hormon, das jetzt als Anion vorliegt, eluiert werden.

Als Säulen wurden die Plastikzylinder von 5 ml-Einmalspritzen verwendet. Das Sephadex-Gel wurde zunächst in 0,1 m Glycin-HCL-Puffer gequollen. Die Ausflußöffnung des Plastikzylinders wurde mit einem runden Stück Filterpapier verschlossen, um das Durchfließen des Gels zu verhindern, dann wurde die Säule mit dem Gel bis auf eine Höhe von 4 - 5 cm aufgefüllt. Der markierte Tracer wurde vorsichtig auf das Gel aufgetragen und das Markierungsgefäß 2mal mit 0,1 m Glycin-HCL-Puffer nachgespült. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 0,5 ml aufgefangen, und gezählt. In den ersten Fraktionen erschien ein Aktivitätsanstieg, der dem Durchlauf des ^{125}J entsprach. Nach ca. 10 Fraktionen war die Aktivität wieder abgefallen, da alle Jodidionen eluiert waren. Nun erfolgte die Umpufferung des pH-Wertes von vorher 3 auf 7,5 mit 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5. In den dabei gesammelten Fraktionen erschien ein erneuter Aktivitätsanstieg, welcher dem markierten Tracer entsprach. Vier Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden in ein Gefäß mit 10 ml Markierungspuffer überpipetiert und im RIA in geeigneter Verdünnung eingesetzt.

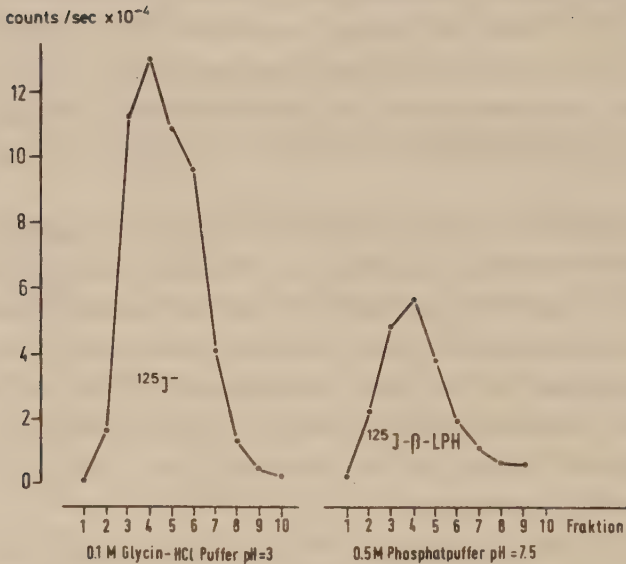


Abb. 8: Elutionsprofil der Tracerreinigung

Auch hier mußte nach der Markierung überprüft werden, ob der Tracer verwendbar war (s. 4.3.1.).

Spezifische Aktivität:

Wir hatten 2 µg p-β-LPH mit 20 µl ¹²⁵J -Lösung = 0,7 mCi markiert. Die Abb. 8 zeigt das Elutionsprofil der Reinigung mittels der SP-Sephadex C-25 Säule. Als Tracer wurden die Fraktionen 3 - 6 des Hormonpeaks verwendet. Das entspricht 30 % der gesamten Aktivität von 0,7 mCi, die eingesetzt worden waren, also 0,21 mCi. Wenn man annimmt, daß alles eingesetzte p-β-LPH markiert wurde, so waren 2 µg p-β-LPH mit 0,21 mCi markiert, was einer spezifischen Aktivität von 105 mCi/mg p-β-LPH entspricht.

5.6.2. Antiserum

Auch hier mußte, bevor eine Eichkurve erstellt werden konnte, das Antiserum bezüglich der Kinetik und der Tracerbindung ausgetestet werden. Die Bindungskurve wurde erstellt, indem Dreifachwerte mit 100 µl Nullserum, 100 µl Antiserumverdünnung und 100 µl Tracer 24 Stunden bei 4°C inkubiert wurden; anschließend wurden die Proben, wie später ausgeführt, getrennt. Das Antiserum wurde in einer geometrischen Verdünnungsreihe von 1 : 500 bis 1 : 32 000 eingesetzt. Eine Bindung von ca. 30 % der Gesamtaktivität des eingesetzten Tracers an das Antiserum wurde bei einer Verdünnung von 1 : 4 000 erreicht. Ebenso wie beim β -Endorphin wurde eine Kinetik der Reaktion von Tracer und Antiserum erstellt. Nach ca. einem Tag findet keine wesentliche Reaktion mehr statt. Im RIA wurde dementsprechend eine kalte Vorinkubation von 24 Stunden bei 4°C und eine heiße Inkubation von nochmals 24 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Die Trennung haben wir auch hier mit Hilfe der optimierten Doppelantikörpertechnik vorgenommen. Da auch dieses Antiserum vom Kaninchen stammte, konnte dasselbe 2. Antiserum, von der Ziege gegen das Kaninchen gerichtet, verwendet werden. Wieder mußte die Verdünnung des zweiten Antiserums und die Inkubationszeit anhand einer Bindungskurve und Kinetik ausgetestet werden.

50 µl Antiserumverdünnung und 500 µl 6 %ige PEG-Lösung je Probe wurden eingesetzt. Das Antiserum und die PEG-Lösung wurden mit dem Assay-Puffer verdünnt. Die PEG-Lösung enthielt außerdem 14 µg/ml Kaninchen- γ -Globulin. Nach der Inkubation der Proben wurden diese 15 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Aktivität des Niederschlages gezählt.

Für die Bindungskurve wurde das Antiserum in Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 320 eingesetzt. Eine Verdünnung von 1 : 40 des zweiten Antiserums reicht zur Fällung aus. Für die Kinetik wurde die Trennung durch zentrifugieren nach Inkubationszeiten des zweiten Antiserums und der PEG-Lösung von 5, 10, 15, 20, 30, 50 und 110 min durchgeführt. Auch hier ist die Komplexbildung bereits nach 5 min abgeschlossen.

Die Proben wurden, nachdem der Überstand nach dem Zentrifugieren abgesaugt war, in einem 16-Kanal- γ -Zählgerät gezählt und die auf einen Lochstreifen gestanzten Zählraten in der EDV-Anlage wie in 5.4.2. ausgewertet.

Das endgültige Pipettier- und Inkubationsschema erfolgte wie in 5.4.4..

5.6.3. Ergebnisse

Der Verlauf einer typischen Eichkurve ist in Abb. 9 dargestellt. Zur Testung der Kreuzreaktion des humanen β -LPH mit dem Schweine- β -LPH wurde das h- β -LPH in Konzentrationen von 0,63, 2,5 und 10 ng/ml im p- β -LPH-RIA gemessen. In keiner dieser eingesetzten Proben war das humane β -LPH in der Lage, den p- β -LPH-Tracer vom Antiserum zu verdrängen. Es findet also keine meßbare Kreuzreaktion des h- β -LPH mit dem p- β -LPH statt, sodaß mit diesem p- β -LPH-RIA kein humanes β -LPH gemessen werden kann.

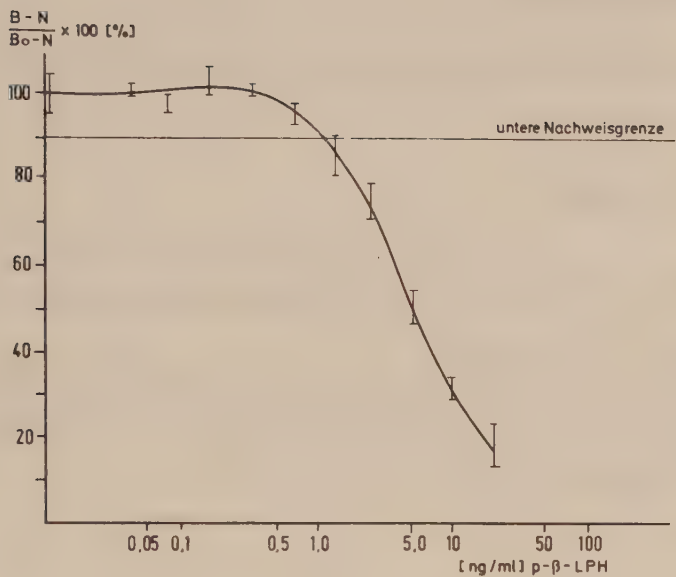


Abb. 9: Standardeichkurve für das p-β-LPH

Untere Nachweisgrenze: 0,997 ng/ml

50-Prozent-Intercept: 5,2 ng/ml

6. EXTRAKTION

Wie die Ergebnisse von 5.4.3. zeigten, ist es notwendig, das β -Endorphin aus dem Serum zu extrahieren.

6.1. Prinzip

Das Prinzip dieser Extraktionsmethode stammt von VAUDRY, OLIVER und Mitarbeiter (37). Sie wurde bereits für das ACTH untersucht und modifiziert.

Diese Extraktionsmethode beruht auf der Adsorption des β -Endorphins an Kieselgel während eines Schüttelvorganges mit anschließender Elution durch ein geeignetes Elutionsmittel.

6.2. Methodik

Es wurde eine Kieselgelsuspension hergestellt, die 40 g Kieselgel in einem Liter Puffer A enthielt. Unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer wurden davon je 500 μ l in Polypropylenzentrifugenröhrchen pipettiert. Dazu wurden je 400 μ l Serum zugegeben und anschließend wurden die Proben 5 min auf einem Vibrationsschüttler geschüttelt (Adsorption).

Die Proben wurden 5 min bei 4°C und 2 000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 1 ml Aquadest., kurzes Aufschütteln und 5 min zentrifugieren erfolgte ein Waschvorgang. Dieser Überstand wurde ebenfalls verworfen. Die Elution des β -Endorphins vom Kieselgel wurde durch Zugabe von 2 ml Elutionsmittel, 5 min Schütteln und anschließendem Zentrifugieren von 15 min durchgeführt. Jeweils 1,5 ml des Eluats wurden in Zentrifugenröhrchen überpipettiert, mit einem durchlöchernten Deckel verschlossen

und bei -80°C tiefgefroren. Nachdem die Proben gefroren waren, wurden sie gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 200 μl Assay-Puffer aufgelöst. Davon wurden jeweils 100 μl im RIA eingesetzt.

6.3. Vorversuche zu den Elutionsbedingungen

Einfluß der Elutionszeit auf die Ausbeute:

Um zu testen, ob durch eine längere Schüttelzeit bei der Elution mehr β -Endorphin vom Kieselgel eluiert werden könnte, wurden jeweils 400 μl β -Endorphintracerhaltiges Nullserum extrahiert, wobei die Schüttelzeiten der Elution 5, 10, 15 und 20 min betrugen. Es wurde jeweils die Gesamtaktivität und die Aktivität nach der Gefriertrocknung der Proben gemessen.

In der Abb. 10 ist die extrahierte Aktivität in Prozent der Gesamtaktivität in Abhängigkeit von der Elutionszeit dargestellt. Eine Schüttelzeit, die länger als 5 min dauert, verändert die Ausbeute also nicht.

Einfluß der Elutionsmittelmenge:

Es wurde wieder β -Endorphintracerhaltiges Nullserum extrahiert, wobei mit jeweils 1, 2 und 3 ml Elutionsmittel eluiert wurde, entsprechend wurden 0,5, 1,5 und 2,5 ml des Eluats überpipettiert.

Aus der Abb. 10 kann man entnehmen, daß mit 3 ml Elutionsmittel zwar noch etwas mehr β -Endorphin eluiert werden kann, aber dennoch wurde eine Elutionsmittelmenge von 2 ml gewählt, da sonst die Lyophilisationszeit bei einem großen Ansatz zu lange wird.

Einfluß der β -Endorphinmenge:

Um festzustellen, ob die β -Endorphinkonzentration einer Serumprobe einen Einfluß auf die prozentuale Extraktionsbeute hat, ob also bei einer hohen Konzentration der gleiche Anteil extrahiert wird wie bei einer niedrigen, wurden β -Endorphinstandards in Nullserum gelöst, entsprechend den Standardkonzentrationen der Eichkurve, also von 0,04 bis 20 ng/ml und jeweils eine konstante Menge β -Endorphin-Tracer zugegeben. Diese Proben, die jeweils dieselbe Aktivität hatten, wurden, wie in 6.2. beschrieben, extrahiert. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt. Es wurde im gesamten Meßbereich dieselbe Extraktionsausbeute erhalten. Die prozentual extrahierte Menge an β -Endorphin ist also unabhängig von der Konzentration des β -Endorphins.

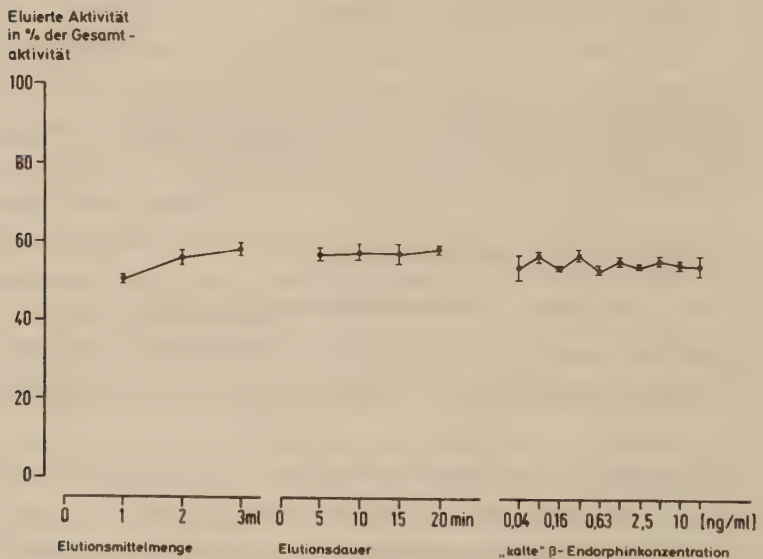


Abb. 10: Abhängigkeit der prozentual extrahierten β -Endorphinmenge von den Elutionsbedingungen (Elutionsmittelmengen, Elutionsdauer, „kalte“ β -Endorphinkonzentration; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Einfluß des Eluat-Abgießens bzw. -Überpipettierens:

Es wurden Proben tracerhaltigen Nullserums extrahiert, einmal das Eluat abgegossen und das anderemal ein Aliquot von 1,5 ml überpipettiert. Die Streubreite der prozentual extrahierten β -Endorphinmenge lag beim Abgießen über 20 %, nämlich zwischen 60 % und 83 %. Dieser Fehler ließ sich durch Überpipettieren auf ca. 5 % verringern.

6.4. Ergebnisse

Ausbeute und Präzision:

Es wurden jeweils 10 Proben tracerhaltigen Nullserums zu verschiedenen Zeiten extrahiert.

Die Extraktionsausbeute lag zwischen 53 % und 56 %. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 2,4 und 5,4.

Präzision der β -Endorphin-Extraktion:

	Probenzahl	mittlere extra- hierte Aktivi- tät in %	s	V. K. %
1	n = 10	55,8	1,8	3,2
2	n = 10	56,7	1,4	2,4
3	n = 10	53,6	2,9	5,4

Der Extraktionsverlust von knapp 50 % wurde bei der Resuspendierung durch Volumeneinengung um den Faktor 2 wieder ausgeglichen.

7. GESAMTMETHODE RIA UND EXTRAKTION

7.1. Intra-Assay-Variation

Für die Intra-ASSAY-Variation wurden von drei Seren mit verschiedenen hohen β -Endorphinkonzentrationen jeweils 10 Proben extrahiert und im Radioimmunoassay eingesetzt. Dabei erhielten wir folgende Ergebnisse:

Probenzahl	$\bar{x}$ (ng/ml)	s (ng/ml)	V. K. %
10	0,25	0,09	35,8
10	2,19	0,6	27
10	8,42	1,37	11,8

7.2. Verdünnungstest

Für diesen Test wurden drei Serumproben mit Nullserum verdünnt und von jeder Verdünnung drei Proben extrahiert und im Radioimmunoassay eingesetzt. Das Ergebnis ist in der Abb. 11 dargestellt. Wie zu erwarten, liegen die Punkte auf einer Geraden, die durch den Nullpunkt geht.

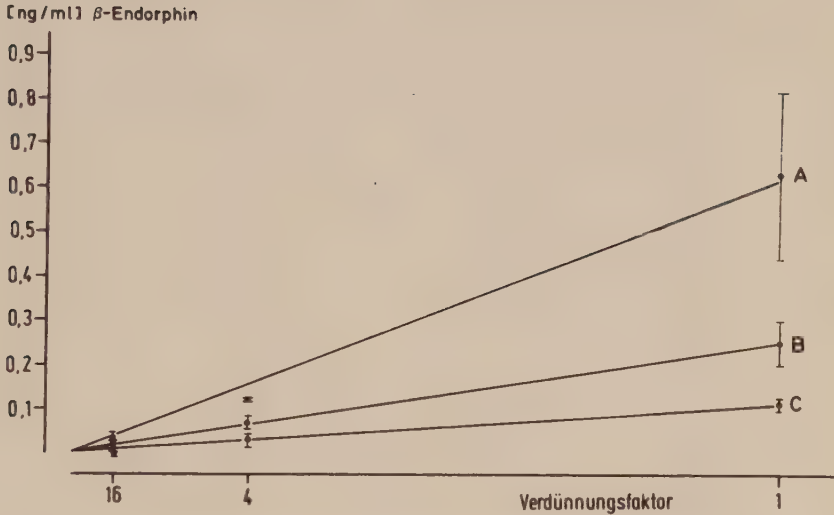


Abb. 11: Verdünnungstest zur Untersuchung der Richtigkeit des RIA.

A, B und C sind verschiedene Seren, die mit Nullserum verdünnt wurden.

7.3. Klinische Ergebnisse

Um festzustellen, mit welchem Standard, dem der Fa. Peninsula oder dem der Fa. Serva, im menschlichen Serum das β -Endorphin gemessen werden kann, wurden Seren mit bekannt hoher ACTH-Konzentration sowohl im Serva-RIA als auch im Peninsula-RIA gemessen. Da das ACTH parallel zum β -Endorphin sezerniert wird (2, 6, 11, 13, 23, 28, 29, 32, 38), konnten wir annehmen, daß in diesen Seren das β -Endorphin auch pathologisch erhöht ist. Dabei erhielten wir die in Abb. 12 dargestellte Korrelation, die erkennen läßt, daß

so nicht festzustellen ist, ob das β -Endorphin der Fa. Peninsula oder das der Fa. Serva dem im menschlichen Serum vorkommenden β -Endorphin ähnlicher ist.

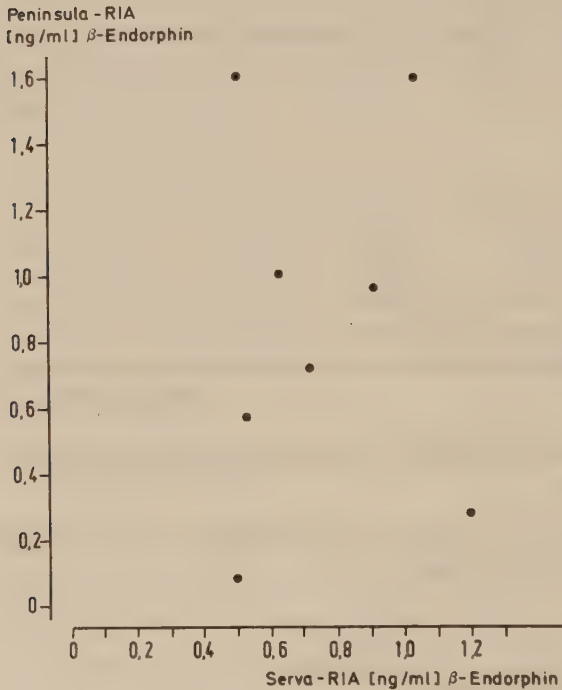


Abb. 12: Korrelation von Serumwerten,
die im Serva-RIA und im Peninsula-RIA gemessen
wurden.

Außerdem haben wir das β -Endorphin in Hypophysenperifundaten von Siebenschläfern, die wir von Dr. Kromer (Pharmakologie) erhielten, mit dem Serva- und Peninsula-RIA gemessen. Die Hypophysen waren mit CRF, welcher aus ektopischen Gewebe extrahiert worden war,

stimuliert worden, sodaß die Perifundate sowohl eine hohe ACTH- als auch β -Endorphin-Konzentration enthielten. Dabei erhielten wir folgendes Ergebnis:

Tier-Nummer	Serva-RIA (ng/ml)	Peninsula-RIA (ng/ml)
1	2 690	31,5
2	4 520	22,5
3	2 250	60,5
4	1 760	6
5	6 850	66,5
6	460	3
7	1 077	3,5
8	4 350	34,5
9	4 260	33
10	7 470	47,5

Hiernach ist im Serva-RIA viel mehr β -Endorphin nachweisbar, als im Peninsula-RIA. Dies muß jedoch nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sein, denn gemessen wurde β -Endorphin-immunoreaktivität von Hypophysenperifundaten von Siebenschläfern. Außerdem könnte die Kreuzreaktion mit anderen Neurohormonen bei zwei verschiedenen Antiseren doch einen großen Einfluß haben (s. 5.5.2.).

8. DISKUSSION

Bei der radioimmunologischen Bestimmung des β -Endorphins sind mehrere Probleme aufgetaucht:

- 1.) Antiserumgewinnung
- 2.) Extraktion
- 3.) Kreuzreaktivität
- 4.) verschiedene Standardpräparate.

Antiserumgewinnung:

Aufgrund des niedrigen Molekulargewichts des β -Endorphins von ca. 3 500 und der daraus resultierenden niedrigen antigenen Potenz, war es notwendig, das Peptid an ein geeignetes hochmolekulares Trägerprotein zu koppeln. Es sind in der Literatur Kopplungsverfahren des β -Endorphins an Serumalbumin (12, 39) und Thyreoglobulin (14, 33) beschrieben.

Bei Kopplungsverfahren anderer Peptide erwies sich Thyreoglobulin als Trägerprotein vorteilhaft (3, 22, 31, 33). Da in unserem Labor das Kopplungsverfahren von niedermolekularen Peptiden an Thyreoglobulin schon mit Erfolg durchgeführt worden war (22, 32), wurde es von uns auch für das β -Endorphin angewandt. Wir erhielten dabei gute Ergebnisse. Die Antiseren der 4 immunisierten Kaninchen konnten zum RIA verwendet werden. Die anderen 2 Kaninchen starben, bevor sie genügend hohe Antikörpertiter erreichten. Die Titer, in denen sie im RIA eingesetzt wurden, lagen zwischen 1 : 2 000 und 1 : 16 000. Mit diesen Antiseren wurden Standard Eichkurven mit einer unteren Nachweisgrenze von 20 - 95 pg/ml und einem 50 % Intercept von 700 - 900 pg/ml erhalten. Für die Empfindlichkeit der Meßwerte war es entscheidend, daß die Verdünnung der Antiseren eingesetzt wurde, in der das Antiserum eine Tracerbindung von ca. 30 % aufwies.

Extraktion:

Da der Verlauf der Standarddeichkurve im Serum von der im Puffer abwich - sie waren weder parallel noch in der Empfindlichkeit identisch - ist anzunehmen, daß im Serum Störfaktoren vorhanden sind, die die direkte Messung des β -Endorphins im Serum verhindern. Diese Störfaktoren könnten z.B. Serumproteine sein (27), die mit dem β -Endorphin eine Bindung eingehen und so die Reaktion des β -Endorphins mit seinem Antikörper beeinflussen. Um diese Störfaktoren auszuschalten, war es notwendig, ein Extraktionsverfahren durchzuführen. Die meisten für das β -Endorphin beschriebenen Extraktionsverfahren beruhen auf der Adsorptionsfähigkeit des β -Endorphins an Kieselgel. Diese Verfahren werden durch Ausschütteln vorgenommen (13, 14, 37, 39). Das Prinzip der von uns durchgeführten Methode stammt aus einer Arbeit von VAUDRY und OLIVER und wurde mit guten Ergebnissen für das ACTH verwendet (26). Wir haben diese Methode für das β -Endorphin ausgetestet und modifiziert. Die Ausbeute der Extraktion lag bei 53 % - 57 %, der Extraktionsverlust wurde durch Konzentrierung der Proben ausgeglichen. Die Präzision der Methode lag bei 2,4 - 5,4 %.

Kreuzreaktivität:

Eine weitere Problematik der quantitativen radioimmunologischen Bestimmung des β -Endorphins besteht darin, daß das h- β -LPH im β -Endorphin-RIA kreuzreagiert. Um diesen Fehler zu eliminieren, müßte ein zweiter RIA vorhanden sein, mit dem man selektiv das h- β -LPH messen kann, oder das h- β -LPH müßte chromatographisch abgetrennt werden. Da es bis heute nicht gelungen ist, humanes β -LPH synthetisch herzustellen, ist man darauf angewiesen, es aus menschlichen Hypophysen zu extrahieren. Bei dieser Methode ist es schwierig, größere Mengen von h- β -LPH zu gewinnen. Zur Immunisierung von Tieren zur Antikörpergewinnung sind jedoch Mengen in

der Größenordnung von mg notwendig. Es war uns nicht möglich, soviel h- β -LPH zu bekommen. Da wir aber Schweine- β -LPH hatten und das dazugehörige Antiserum freundlicherweise von M. F. El. Etreby, Fa. Schering AG, Berlin, zur Verfügung gestellt bekamen, haben wir damit einen RIA aufgebaut und darin getestet, ob auch das h- β -LPH mit diesem Antiserum reagiert. Es stellte sich jedoch heraus, daß das h- β -LPH nicht mit dem Antiserum, das gegen das p- β -LPH gerichtet ist, reagiert. So war es uns leider nicht möglich, das h- β -LPH selektiv zu bestimmen, und den Fehler, der bei der β -Endorphinbestimmung durch vorhandenes h- β -LPH entsteht, zu berichtigen.

Verschiedene Standardpräparate:

Wir hatten ein synthetisches humanes β -Endorphin-Präparat von der Fa. Serva aus Heidelberg und eines von der Fa. Peninsula Laboratories aus San Carlos, Californien. Wir hatten sowohl Antiseren gegen das Antigen der Fa. Serva als auch gegen das Antigen der Fa. Peninsula gewonnen. Es wurden Eichkurven sowohl durch einen homologen RIA mit Serva-Antigen und Serva-Antikörper, als auch durch einen homologen RIA mit Peninsula-Antigen und Peninsula-Antikörper erstellt. Als wir jedoch den Serva-Standard mit dem Peninsula-Antikörper und den Peninsula-Standard mit dem Serva-Antikörper im RIA einsetzten, stellten wir fest, daß der Serva-Standard mit dem Peninsula-Antikörper nur zu 10 % reagiert, und der Peninsula-Standard mit dem Serva-Antikörper überhaupt nicht reagiert. Aufgrund dieser Tatsache muß angenommen werden, daß diese beiden Peptide in ihrer Struktur nicht identisch sind. Wir haben bei der Fa. Serva angefragt, was die von ihnen bezogene Substanz für eine Struktur besitze und erhielten die Auskunft, dies von ihnen bezogene β -Endorphin sei h- β -LPH 61 - 91 mit der AS Sequenz:

N - Tyr - Gly - Gly - Phe - Met - Thr - Ser - Glu - Lys - Ser -

Glu - Thr - Pro - Leu - Val - Thr - Leu - Phe - Lys - Asn - Ala -
Ile - Ile - Lys - Asn - Ala - Tyr - Lys - Lys - Gly - Glu - COOH.

Dieselbe Information erhielten wir von der Fa. Peninsula. Da wir von dieser Sendung noch die Chargennummer hatten, war Herr Meikyo Shimizu der Fa. Peninsula so freundlich, die Qualitätskontrolle dieser Sendung mitzuteilen. Die Reinheitskriterien lagen bei 98 %.

Ein Faktor, der eine Fehlerquelle darstellen könnte, ist die Tatsache, daß der Methioninrest des β -Endorphins sehr leicht zu Methioninsulfoxid oxidiert wird. Ist das Methionin an der antigenen Determinate beteiligt und verändert, so ist es klar, daß die Reaktion nicht mehr identisch ist.

Um festzustellen, mit welchem RIA im menschlichen Serum β -Endorphin gemessen werden kann, haben wir Seren mit bekannt hoher ACTH-Konzentration also auch hoher β -Endorphinkonzentration (2, 6, 11, 13, 23, 28, 29, 32, 38) sowohl im Peninsula-RIA als auch im Serva-RIA gemessen. Diese Messungen ergaben jedoch so unterschiedliche Ergebnisse, daß wir so nicht feststellen konnten, ob das β -Endorphin der Fa. Peninsula oder das der Fa. Serva dem beim Menschen vorkommenden endogenen β -Endorphin ähnlicher ist.

M. Sofroniew wies in immunhistochemischen Versuchen nach, daß sowohl der Serva-Antikörper als auch der Peninsula-Antikörper an endogenes β -Endorphin von Rattenhypophysen gebunden wird, der Serva-Antikörper jedoch etwas besser (unveröffentlichte Befunde). Da diese Versuche jedoch an Rattenhypophysen gemacht worden sind, ist dies nicht ohne weiteres auf menschliches endogenes β -Endorphin übertragbar. Die Messung der β -Endorphinimmunoreaktivität von Hypophysenperifundaten von Siebenschläfern zeigte eine weitaus höhere Bindung des darin enthaltenen β -Endorphins an den Serva- als an den Peninsula-Antikörper. Aber auch hier besteht dieselbe oben erwähnte Problematik.

daß das β -Endorphin von Siebenschläfern nicht gleich reagieren muß wie menschliches. Außerdem ist nicht sicher, welcher Anteil der im Serva-RIA gemessenen β -Endorphinimmunoreaktivität dem β -LPH entspricht, da hier die Kreuzreaktivität gegenüber dem β -LPH 50 % beträgt, während sie im Peninsula-RIA lediglich 15 % beträgt.

9. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Gewinnung von Antiseren gegen h- β -Endorphin wurde synthetisches humanes β -Endorphin an Thyreoglobulin gekoppelt. Die Koppelung wurde mit Hilfe der Carbodiimidreaktion durchgeführt. Vier der anfangs sechs immunisierten Kaninchen bildeten geeignete Antiseren. Der Titer der Antiseren lag zwischen 1 : 2 000 und 1 : 16 000 in der eingesetzten Gebrauchsverdünnung, das entsprach einer Gesamtverdünnung im Ansatz von 1 : 6 000 bzw. 1 : 48 000.
2. Die radioaktive Markierung des β -Endorphins mit ^{125}J wurde mit der Chloramin T-Methode durchgeführt. Dabei wurde 0,5 μl β -Endorphin mit 0,7 mCi ^{125}J markiert. Die Reinigung wurde durch Extraktion mit Quiso vorgenommen. Die spezifische Aktivität des Tracers lag bei 260 mCi/mg β -Endorphin. Der Tracer konnte 4 - 5 Wochen verwendet werden.
3. Die optimalen RIA-Bedingungen wurden ausgetestet, indem Bindungskurven des Antiserums mit dem markierten Antigen erstellt wurden. Die Antiseren wurden im RIA in einer Verdünnung eingesetzt, die ca. 30 % der Gesamtaktivität des eingesetzten Tracers bindet. Es wurde ausgetestet, daß die Standarddeichkurven bei dieser Verdünnung am empfindlichsten sind.
4. Um die besten Inkubationsbedingungen bezüglich der Empfindlichkeit der Eichkurve zu ermitteln, wurden die Inkubationszeiten ausgetestet. Dabei ergab sich, daß eine kalte Vorinkubation von 24 Stunden bei 4°C und eine heiße Inkubation von 24 Stunden bei 4°C am geeignetsten sind.
5. Zur Trennung des Antikörpergebundenen vom freien Teil des β -Endorphins wurde die optimierte Doppelantikörpertechnik angewandt.

Dabei wurde jeder Probe 50 μ l einer ausgetesteten Verdünnung des 2. Antiserums (1 : 40) und 50 μ l einer 6 %igen PEG-Lösung, die 14 μ g/ml Kaninchen- γ -Globulin enthielt, zugegeben. Nach 5 min konnten die Proben durch Zentrifugieren getrennt werden. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

6. Pipettierschema:

Es wurden in Eppendorfgefäßen jeweils 100 μ l β -Endorphinstandardverdünnung und 100 μ l Antiserumverdünnung bei 4°C 24 Stunden kalt vorinkubiert, nach Zugabe von 100 μ l Tracer mit einer Aktivität von ca. 10 000 cpm/100 μ l weitere 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung mittels optimierter Doppelantikörpertechnik. Die im γ -Zählgerät ermittelten und auf einen Lochstreifen gestanzten Meßwerte wurden in der EDV-Anlage mittels "Spline-Approximation" ausgewertet. Die untere Nachweisgrenze der Kurven lag bei 20 - 95 pg/ml der 50 % Intercept bei 700 - 900 pg/ml.

7. Es wurde die Kreuzreaktivität gegenüber dem ACTH, β -MSH, α -Endorphin, γ -Endorphin und β -LPH bestimmt. Es ergab sich lediglich gegenüber dem β -LPH eine Kreuzreaktion von 15 % im Peninsula-RIA und 50 % im Serva-RIA.
8. Um den Fehler, der durch die Anwesenheit von h- β -LPH entsteht, welches z.T. mitgemessen wird, zu beseitigen, wurde versucht, mit dem Antiserum, das gegen das p- β -LPH gerichtet ist, das h- β -LPH in einem heterologen RIA zu bestimmen. Da das h- β -LPH nicht mit dem gegen das p- β -LPH gerichteten Antiserum reagiert, war dies nicht möglich.
9. Es wurde ein Extraktionsverfahren für das β -Endorphin aus dem Serum ausgetestet, das auf der Adsorptionsfähigkeit von Peptiden an Kieselgel beruht, welche anschließend mit einem sauren Elu-

tionsmittel wieder vom Silikat gelöst werden. Die Extraktionsausbeute betrug 53 - 57 %, die Präzision der Extraktion lag bei 2,4 - 5,4.

10. Es wurden zwei verschiedene synthetische Standardpräparate des β -Endorphins, eines der Fa. Serva und eines der Fa. Peninsula, bezüglich des Eichkurvenverlaufs miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß die beiden Substanzen nicht identisch sind. Es wurde festgestellt, daß in beiden RIAs, sowohl homologer Peninsula-RIA als auch homologer Serva-RIA, endogenes β -Endorphin im Serum gemessen werden kann. Welches nun aber das geeignetere Standardpräparat ist, das dem menschlichen endogenen β -Endorphin eher entspricht, konnte nicht festgestellt werden.

10. LITERATUR

1. BERSON, S.A. and R.S. YALOW:
Radioimmunoassay of ACTH in Plasma
J. Clin. Invest. 47, (1968), 2725
2. BLOOM, F., E. BATTENBERG, J. ROSSIER, N. LING
and R. GUILLEMIN:
Neurons containing β -Endorphin in rat brain exist from
those containing enkephalin: Immunocytochemical studies
Proc. Nat. Acad. Sci., (1975), 1591
3. CHOPRA, J., J.C. NELSON, D.H. SOLOMON e.a.:
Production of antibodies spezifically binding triiodothyronine
and thyroxine
J. Clin. Endocrin. Metab. 32, (1971), 299
4. DAUGHADAY, W.H.:
Anterior Pituitary
J. Endocrin., (1977), 27
5. DESBOQUOIS, B. and G.D. AURBACH:
Use of polyethylene glycol to sepearate free and antibody-
bound peptide hormones in radioimmunoassays
J. Clin. Endocrin. 33, (1971), 732
6. EIPPER, B.A., R.E. MAINS:
Analysis of the common precursur to corticotropin and
endorphine.
J. Biologically Chem. 253, 16, (1978), 5732
7. ERHARDT, F.W.:
Einführung in die Verfahren der Radioimmunoassays
In: Radioimmunoassay and related procedures in Medicine,
Vol. I.
Eds.: Marschner e.a.
Internat. Atomic Energy Agency Vienna, (1974)

8. ERHARDT, F.W. and P.C. SCRIBA:
Probleme der radioimmunologischen h-TSH-Bestimmung
Ärztl. Lab. 20, (1974), 191
9. GOLDSTEIN, A., L.J. LOWNEY, B.K. PAL:
Stereospecific and non - specific interactions of the
morphine congener levorphanol in subcellular fractions
of mouse brain
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, (1971), 1742
10. GROSS, R., P. SCHÖLMERICH:
Lehrbuch der Inneren Medizin
F.K. Scheltener Verlag, Stuttgart - New York, (1977), 991
11. GUILLEMIN, R. e.a.:
 β -Endorphin and Adrenocorticotropin are secreted
concomitantly by the pituitary gland
Science, (1977), 1367
12. GUILLEMIN, R., M. LING and T. VARGO:
Radioimmunoassays für α -endorphin and β -endorphin
Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, (1977), 361
13. HÖLLT, V., O.A. MÜLLER, P. FAHLBUSCH:
 β -Endorphin in human plasma: Basal and pathologically
elevated levels
LIFE Sciences 25, (1979), 37
14. HÖLLT, V., R. PRZEWLOCKI, A. HERZ:
Radioimmunoassay of β -endorphin basal and Stimulated
levels in extracted rat plasma Naunyn - Schmiedeberg's
Archives of Pharmacology 303, (1978), 171
15. HUGHES, J., H.W. KOSTERLITZ, F.M. LESLIE:
Effect of morphine on adrenergic transmission in the
mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist
potencies of narcotic analgesics
Brit. J. Pharmac. 53, (1975), 379

16. HUNTER, W.M. and F.C. GREENWOOD:

Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity

Nature 194, (1962), 495

17. KOSTERLITZ, H.W., R.J. LYDON, A.J. WATT:

The effect of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum

Brit. J. Pharmacol. 39, (1970), 398

18. KROMER, W.:

Endorphine- körpereigene Peptide mit Morphin - ähnlicher Wirkung, in Vorbereitung

19. LABHART, A.:

Klinik der inneren Sekretion

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, (1978), 28

20. Li, C.H.:

β -Endorphin: A new biologically active peptide from pituitary glands

In: Hormonal protein and peptides Lipotropin and related peptides Ed.: C.H. Li

Acad. Press. 5, 35

21. LINDNER:

Chemistry of Steroid Haptens, 39 - 40

22. MADLER, M.:

ACTH: Gewinnung von Antiseren und radioimmunologische Bestimmung

Inaugural-Dissertation, Universität München, 1979

23. MAINS, R.E., B.A. EIPPER and N. LING:

Common precursor to corticotropins and endorphins

Proc. Nat. Acad. Sci., (1974), 3014

24. MARSCHNER, J., H. DOBRY, F. ERHARDT, T. LANDERS-DORFER, B. POPP, C. RINGEL and P.C. SCRIBA:
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels Spline-Funktionen
Ärztl. Lab. 20, (1974), 184
25. MARSCHNER, J., F.W. ERHARDT and P.C. SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay, Standard curve by "Spline funktion"
In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Vol. 1, 111.
Proceedings, Symposium Istanbul,
Intern. Atomic Energy, Vienna (1974)
26. MÜLLER, O.A., R. FINK, X. BAUR, M. EHBAUER, M. MADLER und P.C. SCRIBA:
ACTH im Plasma: Extraktion und Bestimmung
Git-Labor-Medizin, 2, (1978), 117
27. ORF, J.W., J. ELLS, N. JOHANSON, F. VANDERLOISE, A.W. LINDALL:
Extraction of β -endorphin from serum binding proteins
Clin. Res., 27, 2, (1979), 680 A
28. ORTH, D.N., R. GUILLEMIN, N. LING and W.E. NICHOLSON:
Immunoreactive endorphins Lipotropins and corticotropins in a human non pituitary tumor: Evidence for a common precursor
J. Clin. Endocrin Metab., 46, (1978), 849
29. PELLETTIER, G.R. LECLERC, F. LABRIE, J. COTE, M. CHRETIEN and M. LIS:
Immunohistochemical localisation of p-lipotropic hormone in the pituitary gland
Endocrinology, 100, (1977), 770

30. PERT, C.B., S.H. SYNDER:
Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue
Science 179, (1973), 1011
31. SKOWSKY, W.R. and D.A. FISHER:
The use of thyreoglobulin to induce antigenity to small
molecules
J. of Lab. a Clin. Med. 80, (1972), 134
32. SOFRONIEW, M.:
Immunoreactive β -endorphine and ACTH in the same
neurons of the hypothalamic arcuate nucleus in the rat
American J. of Anatomy 154, (1979)
33. SOFRONIEW, M., M. MADLER, O.A. MÜLLER and P.C.
SCRIBA:
A method for the consistent production of high quality
antisera to small peptide hormones
Fresenius Z. Anal. Chem. 290, (1978), 163
34. SOFRONIEW, M.V., W.G. WOOD, O.A. MÜLLER, T.
EVERSMANN, P.C. SCRIBA:
Immunohistochemical and radioimmunological studies of
 β -endorphine in tissue and serum
Ive Colloque de Radioimmunologie de Lyon (1979)
35. SUDA, T., A.S. LIOTTA and D.T. KRIEGER:
 β -Endorphin is not detectable in plasma from normal
human subjects
Science, 202, (1978), 221
36. VAIKUKAITIS, J., J.B. ROBBINS, E. NIESCHLAG and
G.T. ROSS:
J. Clin. Endocrin. Metab. 33, (1971), 988

37. VAUDRY, H., C. OLIVER, R. USATEGUI, F. LEBOULENGER,
M.C. TROCHARD, R. VAILLANT:
Adsorption of polypeptide hormones to silicate powders:
Development of reproducible methods for extracting
ACTH and MSH from plasma
Anal. Biochem. 76, (1976), 281
38. WEBER, E., K.H. VOIGT and R. MARTIN:
Concomitant storage of ACTH and endorphin - like immuno-
reactivity in the secretory granules of anterior pituitary
corticotropins
Brain Res., in press
39. WILKES, M.M., R.D. STEWART, J.F. BRUNI, M.E. QUIGLEY,
S.S.C. YEN, N. LING, M. CHRETIEN:
A specific homologues radioimmunoassay for human β -
endorphin: Direct measurement in biological fluids
J. of Clin. Endocrin. and Metab. 50, (1980), 309
40. WOOD, W.G., G. STALLA, O.A. MÜLLER and P.C. SCRIBA:
A rapid and specific method for separation of bound and
free antigen in radioimmunoassay systems
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, (1979), 111
41. YALOW, R.S. and S.A. BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. Clin. Invest. 39, (1960), 1157
42. YALOW, R.S. and S.A. BERSON:
Radioimmunoassay
In: Methods in investigate and diagnostic endocrinology
Eds.: S.A. BERSON, R.S. YALOW, Vol. II A,
North - Holland
Publishing Comp., Amsterdam, London, American
Elsevier, Publishing Comp. New York.

43. YALOW, R.S. and S.A. BERSON:

Topics on radioimmunoassay of peptide hormones

In: Protein and Polypeptide Hormones

Ed.: M. Margoulies, Excerpt. Medica

Foundation, Intern. Congress Series 161, Amsterdam -

New York - London - Paris - Milano - Tokyo -

Buenos Aires, (1968)

11. LEBENS LAUF

Am 21.08.1956 wurde ich als drittes Kind des Kaufmanns Eduard Ehinger und der Hausfrau Sofie Ehinger, geb. Schönenberger, in Friedrichshafen am Bodensee geboren.

Von 1962 - 1966 besuchte ich die Volksschule in Wasserburg (Kreis Lindau), von 1966 - 1975 das Gymnasium für Mädchen in Lindau, das ich mit dem Abitur abschloß.

Im Wintersemester 1975/76 studierte ich an der Technischen Universität München Mathematik. Im Sommersemester 1976 begann ich an der Ludwig Maximilians-Universität München das Studium der Medizin. Im März 1978 bestand ich dort die Ärztliche Vorprüfung und im März 1979 den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung. Nach dem Wintersemester 1979/80 wechselte ich die Universität und studierte an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster weiter. Dort bestand ich im März 1981 den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung.

Am 20. Februar 1981 heiratete ich den Berufssoldaten Gerhard Schmitz.

Vom Frühjahr 1979 bis Herbst 1980 arbeitete ich im Labor für experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München an dieser Dissertation.

